

CONCENTRACION DEL VIRUS DENGUE 2 EN LA HEMOLINFA DE MOSQUITOS Aedes Aegypti INOCULADOS INTRATORACICAMENTE

ALBERTO MORALES,* MARGARITA ROMERO,** DORA DE CALVACHE**

Se realizó un estudio para determinar si era posible demostrar replicaciones del virus Dengue 2 en la hemolinfa de mosquitos *Aedes aegypti* inoculados intratorácicamente.

Los resultados mostraron que el virus pudo ser detectado en la hemolinfa circulante de los mosquitos por varios días después de la inoculación.

En los mosquitos *Aedes aegypti* inoculados por vía intratorácica con 50 PFU de virus dengue 2 fue posible demostrar el virus en la hemolinfa en el 98% de los casos (89/91) entre los días 3° y 10° post-inoculación.

En el primero y segundo día post-inoculación, la proporción de mosquitos con virus en la hemolinfa fue respectivamente de 1 entre 5 y de 4 entre 5. Entre el undécimo y el decimocuarto día la positividad fue del 36% (9/25).

En 18 mosquitos probados 28 días post-inoculación se logró aislar el virus D 2 en la hemolinfa de un poco más del 88% de los mosquitos inoculados.

Un método simple para obtención de hemolinfa de mosquitos es descrito.

INTRODUCCION

Los trabajos de Gubler y Rosen (1) han demostrado la utilidad de los mosquitos *Aedes albopictus* para el diagnóstico del dengue y han informado sobre la curva de incremento del virus en mosquitos infectados con el mismo agente, tanto por vía oral como

por vía parenteral, empleando para ello determinaciones de la concentración del virus en la totalidad del mosquito. Hemos creído oportuno hacer un ensayo piloto para medir la concentración de uno de los serotipos del dengue, el dengue 2 en la hemolinfa de *Aedes aegypti*, infectados experimentalmente por vía intratorácica, con el ánimo de obtener información preliminar que eventualmente pueda ser útil para identificar el virus en el fluido y para realizar estudios adicionales tendientes a comprender mejor la evolución del virus en el vector.

* M.Sc. Grupo de Entomología, Sección Diagnóstico, Investigación y Referencia. Instituto Nacional de Salud.

** Bacterióloga, Grupo de Virología, Sección Diagnóstico, Investigación y Referencia. Instituto Nacional de Salud.

MATERIALES Y METODOS

Mosquitos

Los mosquitos usados procedían de una colonia de *Aedes aegypti* establecida en 1972 en el laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia, originada a partir de larvas colectadas en el área urbana del municipio de Shagún, Departamento de Córdoba, Colombia. Esta colonia se ha mantenido a una temperatura de 28°C, con humedad relativa de 70%.

Para este trabajo sólo se utilizaron hembras de 72 horas de edad, mantenidas a 30°C con humedad de 70%. Antes y después de la inoculación los mosquitos fueron alimentados con una solución de azúcar en agua al 10%.

Técnica de inoculación intratorácica de los mosquitos

El método usado fue básicamente el descrito por Rosen y Gubler (2), pero en vez de emplear el sistema de presión ideado por éstos autores, utilizamos, con ligeras modificaciones (Dr. Hernando Groot, INS - 1977) el descrito por Spielman (3) y Wong para la inoculación intrarectal de mosquitos, utilizando un tubo en T, el cual conectaba, por una rama a la tubería de presión, por otra a la aguja inocular y por la tercera a un tubo de caucho en el que, por simple acción de los dedos se pudiera regular la presión dentro del sistema y así hacer que ésta expulsara el líquido a través de la aguja (Fig. 1 - A).

La aguja la insertamos en el tapón de caucho de una "cárpula" vacía, de aquellas usadas en anestesia dental, conectada el extremo opuesto de la cárpula al sistema de presión. (Fig. 1-C).

Se usaron agujas calibradas para inocular 0.25 μ l., que en su punta tenían en promedio un diámetro de 0.26 mm.

Las agujas se cargaban usando también el sistema de Spielman y Wong, empleando vacío en vez de presión. (Fig. 1-A).

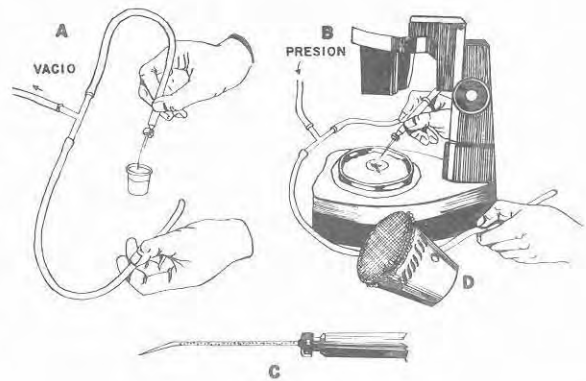


FIGURA No. 1

- A. Llenado de la aguja de inoculación con la ayuda de vacío.
 B. Inoculación del mosquito bajo el microscopio con la ayuda de presión regulada con la mano izquierda.
 C. Detalle de la aguja de inoculación montada en el extremo de un vial.
 D. Vaso de cartón para los mosquitos inoculados.

Para la inoculación del virus, los mosquitos inmovilizados por frío se puncionaban con la aguja en el torax, perforando la membrana en el área comprendida entre el paratergito, la zona post-espiracular y la porción superior de la esternopleura.

Los mosquitos en número nunca superior a doce, se colocaban en vasos "Shellmar", de ocho onzas. Tanto la inoculación como el mantenimiento de los mosquitos se hicieron en laboratorio de seguridad, provisto de todos los elementos necesarios para evitar el escape de los insectos.

Técnica de extracción de la Hemolinfa

La extracción de la hemolinfa se hizo puncionando el tórax del mosquito (en el mismo sitio usado para la inoculación) con una aguja similar a la de inoculación, pero con el diámetro externo de 0,30 mm en su porción afilada. Al hacer la punción la hemolinfa penetraba por capilaridad dentro de la luz de la aguja.

Por el procedimiento mencionado se obtenía generalmente 0,30 μ l de cada mosquito. Una vez obtenida esta cantidad se retiraba la aguja del mosquito, e inmediatamente después se introducía en un recipiente con 0,3 ml de diluyente, forzando la salida de la

hemolinfa, mediante presión para su rápida mezcla con el diluyente. En esta forma la hemolinfa quedaba diluida a 10^{-3} . Cuando se hicieron mezclas de hemolinfa, el fluido de 5 - 10 mosquitos fue diluido en 0.5 - 0.7 ml. de diluyente.

El diluyente empleado fue medio 199 con 4% de suero fetal bovino. Siguiendo este procedimiento una persona adiestrada puede obtener hemolinfa de 15 mosquitos en 5 minutos.

Virus

Se empleó dengue 2, cepa Tr. 1751 pase 60 en cerebro de ratón lactante, liofilizado; la cepa se recibió del Centro de Enfermedades Comunicables de Atlanta donde había experimentado 54 pases. El producto liofilizado se diluyó a 1:10 en medio 199 y en cultivos de tejidos (Células LLCMK₂) y mostró un título logarítmico de 6.3 dex PFU por 1 ml. (50 - PFU por 0,25 ml.). (PFU — Unidades Formadoras de Placas).

Infección de los mosquitos

Los mosquitos fueron inoculados en tres lotes diferentes. El lote 1 comprendía 400 mosquitos inoculados el mismo día cada uno con 0,25 μ l de dilución 1:10 del virus preparado usando medio 199 como diluyente. La cantidad de virus inoculado fue estimado en 50 PFU, basado en la titulación de la porción sobrante del inóculo.

Los lotes 2 y 3 comprendían 160 y 300 mosquitos respectivamente los cuales fueron inoculados en dos diferentes días también con dilución 1:10 del virus (0,25 μ l por mosquito) pero preparado con diferentes ampollas del mismo lote de virus.

Aunque no se hizo titulación de la porción sobrante del inóculo usado para los grupos 2 y 3, no hay ninguna razón para creer que la cantidad de virus en estos inóculos fuera significativamente diferente a aquel inoculado en el grupo 1.

De los 560 mosquitos inoculados en los lotes o grupos 1 y 2, hubo 504 sobrevivientes inmediatamente después de la inoculación.

Los mosquitos que sobrevivieron fueron entonces divididos en 14 grupos de 36 individuos cada grupo con el propósito de examinar un grupo por día durante 14 días consecutivos. En esta forma el primer grupo fue examinado 24 horas después de la inoculación, el segundo 48 después de la inoculación. El mismo día del examen a un número variable de mosquitos, nunca menos de cuatro, se les tomó hemolinfa para examen individual (cuadro No. 1). A los restantes mosquitos también se les tomó hemolinfa pero en lugar de examinarla individualmente se mezclaron las hemolinfas de 5 - 10 mosquitos las cuales, en la mayoría de los casos, se mezclaron en un tubo con 0.5 ml. de diluyente.

Los mosquitos del lote 3, que comprendía 300 mosquitos, fue inoculado con dilución 1:10 del mismo lote de virus empleado en la inoculación de los otros dos lotes de mosquitos. De algunos de estos mosquitos se extrajo hemolinfa, en forma individual, a los 28 días post-inoculación. A cada uno de estos mosquitos se les extrajo 0.30 μ l de hemolinfa aproximadamente la cual se diluyó en 0,30 ml de medio 199. Al mismo tiempo que se hizo el intento de aislamiento de virus se realizó la titulación y para ello se inocularon grupos de ratones lactantes albino suizos de 3-4 días de edad por vía IC con 0.02 ml de las diluciones 10^{-3} a 10^{-6} de cada una de las hemolinfas extraídas. Para el cálculo del título del virus aislado se utilizó la fórmula de Reed y Muench (4) y la identificación del virus se hizo por fijación de complemento.

Titulación e identificación del virus

Lotes 1 y 2: Para medir la concentración del virus en la hemolinfa, diluciones seriadas de este fluido fueron inoculadas en cultivos de tejidos. De otra parte, algunas hemolinfas fueron inoculadas intracerebralmente en ratones para preparar intígenos.

Finalmente, algunas hemolinfas fueron inoculadas solamente en ratones. Diluciones 10^{-3} (inicial), 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6} de hemolinfas individuales o mezclas de hemolinfas fueron inoculadas en células LLC-MK₂ cultivadas en placas Limbro; cada dilución se inoculó a un mínimo de 4 cavidades, en cantidad de

CONCENTRACION DEL VIRUS DENGUE 2 EN LA HEMOLINFA DE MOSQUITOS....

0.05 ml por cavidad, después de un período de absorción de 2 horas a 34°C, se agregó una capa de agarosa mezclada con hidrolizado de Lactoalbúmina, extracto de levadura y 4% de suero fetal bovino; siete días después de incubación en atmósfera de CO₂ a 37°C, se añadió la capa de Agar Noble con rojo neutro y las placas fueron contadas 24 horas más tarde. Las cepas aisladas del tercer lote de mosquitos inoculados se tituló en ratones lactantes albino suizos de 3-5 días de edad.

Los antígenos fueron preparados a partir de cerebros de ratones enfermos que habían sido inoculados con una dilución 10⁻³ de hemolinfa. Los cerebros se suspendieron al 10% en solución buffer de veronal para probarlos por fijación de complemento (4-5) con líquidos ascíticos hiperinmunes para dengue 1, 2, 3 y 4.

Como control negativo se inocularon grupos de mosquitos en la misma forma que los inoculados con virus pero reemplazando el virus con diluyente 199; a estos mosquitos controles se les siguió el mismo procedimiento de extracción de hemolinfa y procesos consiguientes.

RESULTADOS

Los resultados de formación de placas por virus dengue 2 de la hemolinfa de los mosquitos probados individualmente en diferentes días post-inoculación hasta el día 14 se muestran en el cuadro No. 1.

Se encontró que desde el primer día posterior a la inoculación, una de cinco hemolinfas produjo formación de placas en células LLC-MK2 (20%); el segundo día post-inoculación 4 de 5 mosquitos formaron placas (80%); y del tercer día post-inoculación hasta el décimo día los resultados para formación de placas fueron positivos en un 100% o cerca de esta cifra. Desde el día once hasta el catorce la positividad fue menor pero siempre se encontraron mosquitos positivos en estos días.

Las hemolinfas del primero y segundo día post-inoculación no se titularon; únicamente

se probaron en la dilución 10⁻³ para ver si producían placas. Las hemolinfas restantes, cada una por separado, se titularon en células LLC-MK2. El cuadro No. 1 muestra el promedio y el rango de las titulaciones individuales por 0,3 ul.

El promedio de los títulos del virus en la hemolinfa de los 102 mosquitos positivos estudiados entre el 3° y el 14° día, post-inoculación fue de log. 2.25.

CUADRO No. 1

TÍTULOS DE LA HEMOLINFA DE AEDES AEGYPTI INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON VIRUS DENGUE 2 Y PROBADA PARA FORMACION DE PLACAS EN CELULAS LLC - MK2

Días post-inoculación del virus dengue 2 en los mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	Número de mosquitos probados individualmente en células LLC-MK2		Título Log PFU por 0,3 µl células LLC - MK2	
	Positivos / Total	% Positivos	Promedio	Variación
1	1/5	20	*	
2	4/5	80	*	
3	5/5	100	2.7	1.5 - 3.8
4	5/5	100	2.2	1.8 - 2.5
5	12/12	100	2.6	1.3 - 3.3
6	14/15	93.3	2.2	1.7 - 2.9
7	13/14	92.8	2.2	1.1 - 3.8
8	16/17	94.1	2.2	1.3 - 3.5
9	8/8	100	2.5	1.9 - 3.4
10	15/15	100	2.5	1.3 - 2.5
11	2/8	25	2.2	2.1 - 2.2
12	2/4	50	1.9	1.2 - 2.6
13	2/8	25	2.1	2.1 - 2.2
14	3/5	60	1.8	1.3 - 2.6

* No se hizo titulación

El promedio en los días 3-10 fue de 2.4. No se observaron diferencias significativas entre los títulos de los diferentes días.

Del primero al décimo día después de la inoculación de los mosquitos, se extrajo hemolinfa a varios de estos para constituir cada día una o más mezclas. Así, pues, la hemolinfa de varios mosquitos (5 a 10 mosquitos) se diluían en 0,5 ó 0,7 ml de medio 199. Los resultados de la inoculación de estos pools de hemolinfa para producción de

placas y su título se muestran en el cuadro No. 2. En el primer día post-inoculación 2 de los 3 pools mostraron formación de placas, lo cual está de acuerdo con los resultados de los exámenes de los mosquitos individuales.

CUADRO No. 2

TÍTULOS DE POOLS DE HEMOLINFA DE MOSQUITOS *Aedes Aegypti* EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON VIRUS DENGUE 2 Y PROBADA PARA FORMACION DE PLACAS EN CELULAS LLC - MK2

Días post-inoculación del Virus en los mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	No de pools de mosquitos probados con células LLCMK2 Positivos / Total	Títulos log PPU por 1,5 µl células LLCMK2	
		Promedio	Variación
1	2/3 *	—	—
2	2/5	3.76	3.9 - 4.0
3	3/5	3.6	3.4 - 3.8
4	3/5	≥ 2.8	***
5	5/5	3.6	2.9 - 4.4
6	2/2	3.5	**
7	3/3	≥ 3.1	***
8	2/3	4.4	**
9	2/2	≥ 2.8	***
10	0/1	—	—

* No se hizo titulación

** Únicamente se tituló un pool

*** No se buscó el punto final

Para comprobar que el virus aislado de la hemolinfa era dengue 2, inoculamos ratones en tres ocasiones con el producto de un mosquito cada vez y en siete con mezclas de hemolinfas. Los resultados se presentan en el cuadro No. 3 el cual muestra que en todos los casos el virus desarrollado en el cerebro de los ratones era dengue 2.

Los títulos de las mezclas son análogos a los títulos de los mosquitos individuales; sin embargo en la mezcla del décimo día (cuadro No. 2), constituido por 5 mosquitos, no demostramos virus, sin que tengamos explicación para este fenómeno, aparentemente en contradicción con la demostración del virus en la totalidad de los 15 mosquitos probados individualmente también diez días después de la inoculación (cuadro No. 1). En el cuadro No. 4 se muestran los resultados

del intento de aislamiento de virus en 18 mosquitos a los cuales se les extrajo hemolinfa 28 días después de inoculados. Un total de 18 mosquitos fueron probados para presencia de virus en la hemolinfa y en 16 de ellos se demostró virus circulante, es decir, una positividad de un poco más del 88%. Los títulos de las cepas de virus aislados de la hemolinfa de los 16 mosquitos en ratones lactantes variaron de log. 3.0 a log. 5.5. Los resultados de la prueba de fijación de complemento con líquidos ascíticos hiperinmunes anti D₁, D₂, D₃, y D₄ en las 16 hemolinfas en las cuales se demostró virus, indican que el virus recuperado es D₂. Solamente en dos hemolinfas de las 18 probadas no se logró demostrar virus; sin embargo, los 2 mosquitos correspondientes a estas hemolinfas negativas fueron probados para intento de aislamiento de virus y en los dos mosquitos, se demostró presencia de virus D₂.

Todos los controles normales fueron negativos.

CUADRO No. 3

RESULTADOS DE LA FIJACION DE COMPLEMENTO USANDO ANTIGENOS CRUDOS DE CEREBRO DE RATON LACTANTE INOCULADOS CON HEMOLINFA DE MOSQUITOS *Aedes Aegypti* PREVIAMENTE INOCULADOS POR VIA PARENTERAL CON VIRUS DENGUE 2 Y QUE HABIAN SIDO TITULADOS EN CELULAS LLC - MK2

Número de mosquitos	Días post-inoculación de los mosquitos	Líquido ascítico Hiperinmune			
		D 1	D 2	D 3	D 4
1	7	0	32/32 *	8/8	0
1	7	0	32/32	8/16	0
1	10	4/4	32/32	8/16	0
5	4	**	32/64	8/16	***
5	8	0	32/32	8/8	0
5	9	**	32/64	8/8	***
10	10	0	64/32	8/16	0
5	13	0	32/32	8/8	0
5	14	0	64/32	8/8	0
10	14	4/8	64/32	8/16	0

* El numerador corresponde a la dilución del líquido ascítico inmune y el denominador a la dilución del antígeno.

** No se hizo

CONCENTRACION DEL VIRUS DENGUE 2 EN LA HEMOLINFA DE MOSQUITOS....

CUADRO No. 4

RESULTADOS DEL INTENTO DE AISLAMIENTO Y TITULACION DE VIRUS A PARTIR DE LA HEMOLINFA DE MOSQUITOS AEDES AEGYPTI EXTRAIDA 28 DIAS POST-INOCULACION DE LOS MOSQUITOS CON VIRUS DENGUE 2 Y DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO USANDO ANTIGENOS CRUDOS DE CEREBRO DE RATON LACTANTE.

Mosquito No	Título Log LD50/0.02 ml	Líquido ascítico hiperinmune			
		D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
1	5.4	16/32	64/32 *	0	0
2	3.6	32/16	64/32	0	16/4
3	5.5	16/16	64/32	16/4	32/4
4	3.6	32/8	32/64	0	4/4
5	5.2	16/8	64/32	4/4	4/4
6	3.5	32/8	32/64	8/4	16/4
7	Negativo				
8	4.8	8/8	32/16	0	0
9	3.7	16/16	64/64	16/4	8/4
10	5.3	16/8	64/32	16/4	8/4
11	3.2	8/8	32/16	4/4	0
12	4.0	16/16	64/16	0	0
13	5.5	8/16	32/16	0	0
14	5.5	16/16	32/8	0	0
15	3.2	8/16	32/32	16/8	0
16	Negativo				
17	3.0	16/16	32/8	0	0
18	3.4	8/4	16/8	0	0

* El numerador corresponde a la dilución del líquido ascítico hiperinmune y el denominador a la dilución del antígeno.

DISCUSION

El virus detectado en la hemolinfa parece ser el resultado de la multiplicación del inóculo, pues habiéndose inoculado 1.7 dex PFU (50 PFU) en 0.25 µl los cuales probablemente habían de circular en la totalidad de la hemolinfa del mosquito, en los días 3 a 10, post-inoculación, recuperamos por lo menos 2.2 dex en 0.3 µl de hemolinfa con un promedio de dex 2.4. A la luz de los conocimientos actuales es muy difícil apreciar en su justo valor el incremento del virus en la hemolinfa, pues no se conoce el volumen total de esta en el mosquito ni la manera como las partículas virales se intercambian entre la hemolinfa y las células en las cuales se replican. De todas maneras las partículas recuperadas de la hemolinfa son mayores en número que las inoculadas y aquellas encontradas varios días después de la inoculación probablemente no se explican sino por replicación de las inoculadas en las células tisulares.

Desafortunadamente en el momento actual no tenemos datos sobre el título del virus en los diferentes tejidos de los mosquitos inoculados, para compararlos con los títulos hallados en la hemolinfa.

Los títulos del virus recuperado en la hemolinfa de 16 mosquitos 28 días post-inoculación variaron de log. 3.0 a log. 5.50. Sin embargo, 2 hemolinfas fueron negativas a pesar de que el virus se detectó en el mosquito correspondiente.

No tenemos hasta el momento ninguna explicación para este hecho. Es necesario probar esta técnica de aislamiento del virus en la hemolinfa de mosquitos infectados en condiciones naturales puesto que si se obtienen los mismos resultados se podría hacer el intento primario de aislamiento del virus a partir de la hemolinfa conservándose el mosquito completo para posteriores verificaciones de su identidad taxonómica y otros estudios virológicos.

SUMARY

A study was made to determine if it was possible to demonstrate the replication of Dengue 2 virus in the haemolymph of *Aedes aegypti* mosquitoes previously inoculated intrathoracically. The results showed that the virus could be detected in the circulating haemolymph of the mosquitoes for several days after the inoculation.

In a first experiment, in mosquitoes *Aedes aegypti*, inoculated parenterally with approximately 50 PFU of dengue 2 virus, it was possible to demonstrate the virus in the haemolymph in 98% (89/91) of the mosquitoes examined between the third and the tenth day after inoculation. Between the 11th and the 14th day the positiveness was 36% (9/25). The average virus titer in the haemolymph was dex 2.25 PFU per 0.3 µl.

In a second experiment of 18 mosquitoes inoculated 28 days before virus was demonstrated in the haemolymph of 16 specimens. A simple method to obtain haemolymph from mosquitoes is described.

AGRADECIMIENTO

Deseamos agradecer al Doctor Hernando Groot su ayuda y consejo en la realización de este trabajo, a la señorita Magali Forero por el suministro de las células, a los señores Héctor Agudelo, José del Carmen Muñoz y Miguel Castro por su ayuda en el mantenimiento y cuidado de los mosquitos y a las señoras Alcira Díaz y Nubia Bernal de Bulla por su ayuda en la transcripción del texto.

BIBLIOGRAFIA

1. Gubler D, Rosen L. Quantitative aspects of replication of viruses in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) after oral and parenteral infection. J. Med. Ent. 1977; 13 No. 4-5: 469.
2. Rosen L, Gubler D, The use of mosquitoes to detect and propagate Dengue viruses. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 1974; 23:1153.
3. Spielman A, Wong J. Dietary factors stimulating oogenesis in *Aedes aegypti* Biol. Bull. 1974; 147: 433.
4. Reed LJ, Muench HA. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 1938; 27:493.
5. Casals J. Immunological techniques for animal viruses. K. Maranorosch and H. Koprowski eds. Methods in Virology. Academic Press, New York and London. 1967; pgs. 113-198.
6. Sever JL. Application of a microtechnique to viral serological investigations. J. Immunol. 1962; 88:320.